

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktorium: Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn
und Prof. Dr. H.-G. Lasch

**Untersuchungen
zum katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel
des Menschen — In Abhängigkeit von physiologischen
und pathologischen Bedingungen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *venia legendi*
an der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dieter Platt

Gießen 1970

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktorium: Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn
und Prof. Dr. H.-G. Lasch

**Untersuchungen
zum katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel
des Menschen – In Abhängigkeit von physiologischen
und pathologischen Bedingungen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
an der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dieter Platt

Gießen 1970



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharid-
stoffwechsel des Menschen - in Abhängigkeit von
physiologischen und pathologischen Bedingungen
(Zusammenfassung)

	Seite
EINLEITUNG	1
PROBLEMSTELLUNG	6
METHODIK	7
NACHWEIS DER GLYCOSAMINOGLYCANO-HYDROLASEN IN SERUM UND ORGANEN	10
AKTIVITÄTSMESSUNGEN DER GLYCOSAMINOGLYCANO-HYDROLASEN IN ABHÄNGIGKEIT VON PHYSIOLOGISCHEN UND PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN:	11
Untersuchungen am hyalinen Knorpel	12
Untersuchungen an Aorten, Femoralarterien und Femoralvenen	16
Aktivitätsmessungen im Verlauf der Schwangerschaft	19
Aktivitätsmessungen bei Lebererkrankungen	23
Aktivitätsmessungen bei Mucopolysaccharidosen	24
SCHLUSSBEMERKUNGEN	25
VERZEICHNIS DER SONDERDRUCKE	36
LITERATURVERZEICHNIS	39

UNTERSUCHUNGEN ZUM KATABOLEN MUCOPOLYSACCHARIDSTOFFWECHSEL
DES MENSCHEN - IN ABHÄNGIGKEIT VON PHYSIOLOGISCHEN UND
PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

BINLEITUNG

Die morphologische Struktur der verschiedenen Bindegewebsformen wird durch das qualitative und quantitative Verhältnis der Einzelkomponenten geprägt. So ist das lockere, blutgefäßführende Bindegewebe, das interstitielle Bindegewebe der Organe, aus Fibroblasten, Fibrozyten, Histiozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Gewebsmastzellen und aus etwa gleichen Mengen an amorpher Grundsubstanz und fasrigen Anteilen aufgebaut. Die blutgefäßlosen Bindegewebsformen, wie hyaliner Knorpel, Sehnen, Bänder, Zwischenwirbelscheiben, sind dagegen durch das Überwiegen einer Komponente der nicht zellulären Anteile ausgezeichnet. Der differenzierte Aufbau kommt in der unterschiedlichen Funktion der einzelnen Bindegewebstypen zum Ausdruck. Das lockere Bindegewebe ermöglicht einmal den Zusammenhang der Organe und das Gleiten gegeneinander. Zum anderen kann es als Transportstrecke der Substrate vom Blutgefäß zur Zelle angesehen werden. Die gemeinsamen Merkmale der verschiedenen Knorpelarten sind die sogenannten "druckelastischen Einheiten", die aus Knorpelzellen und umgebender Interzellulärsubstanz bestehen. Die Funktion der Sehnen und Bänder ist vorwiegend auf Zugspannung ausgerichtet. Dem morphologischen Aufbau des Bindegewebes entspricht ein chemisches Äquivalent. Die kollagenen und elastischen Fasern werden durch die Skleroproteide Kollagen und Elastin aufgebaut,

die durch eine charakteristische Aminosäuresequenz, eine große mechanische Belastbarkeit und eine relativ geringe Angreifbarkeit durch proteolytische Enzyme ausgezeichnet sind. Während Kollagen reich an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin ist, enthält Elastin wenig Hydroxyprolin und kein Hydroxylysin, dagegen ist es reich an aliphatischen Aminosäuren, wie Valin, Leucin und Isoleucin.

Die lichtmikroskopisch homogen erscheinende Grundsubstanz erweist sich bei der chemischen Analyse als ein Gemisch verschiedenster Substanzen, unter denen vor allem den polyanionischen Heterosacchariden eine große Bedeutung zukommt. Diese polymeren Kohlenhydrate zeigen einen charakteristischen Aufbau, indem sogenannte "repeating units" zur Bildung linearer Kettenmoleküle führen (Tab. I). Je nach Organ weisen diese Polyaniomen, die auch als saure Mucopolysaccharide oder saure Glycosaminoglycane bezeichnet werden, qualitative und quantitative Unterschiede auf. Neben den sauren Mucopolysacchariden können in der Grundsubstanz der verschiedenen Bindegewebsformen neutrale Mucopolysaccharide nachgewiesen werden, die sich durch einen geringen Gehalt bzw. das Fehlen von Uronsäure und Estersulfat auszeichnen. Bei der chemischen Analyse findet man neben einem Proteinanteil von etwa 50% Galaktose, Mannose, Fucose, Glucosamin und Neuraminsäure. Die Synthese der interzellulär gelegenen Skleroproteide, sauren Glycosaminoglycane und neutralen Mucopolysaccharide erfolgt durch die in allen Bindegewebsformen vorhandenen Fibroblasten oder Fibrozyten. Eine solche Synthese ist jedoch nur dann möglich, wenn die

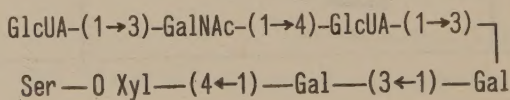
NAME	STRUKTUR DER " REPEATING UNIT "	ORGAN
HYALURONSAURE	$(Gs \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gl \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Aorta, Glaskörper d. Auges. Nabelschnur, Gelenknorpel
CHONDROITIN - 4 - SULFAT	$(Gs \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gal - 4 - sulfat \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Aorta, Knorpel
CHONDROITIN - 6 - SULFAT	$(Gs \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gal - 6 - sulfat \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Aorta, Knorpel, undifferenziertes Bindegewebe
DERMATANSULFAT	$(Is \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gal - 4 - sulfat \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Aorta, Haut
CHONDROITIN	$(Gs \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gal \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Cornea
KERATOSULFAT	$(Gal \overset{B}{(1 \rightarrow 3)} N - Ac - Gl - 6 - sulfat \overset{B}{(1 \rightarrow 4)})_n$	Knorpel, Cornea, Aorta
HEPARIN	genaue Struktur noch nicht bekannt. Bausteine: Glucuronsäure, Sulfat, N- Sulfonyl- D- glucosamin, B- glycosid.Bindung	Leber, Lunge, Aorta
HEPARITINSULFAT	genaue Struktur noch nicht bekannt. Bausteine: Glucuronsäure, Sulfat, N - Acetyl- glucosamin, N - Sulfonyl - D - glucosamin.	Aorta, Lunge

Abkürzungen: Gs = D - Glucuronsäure (- pyranosyl)
N-Ac-Gal = N - Acetyl - D - galaktosamin (2 - Acetamido - 2 - desoxy - B - D - galactopyranosyl)
N-Ac-Gl = N - Acetyl - D - glucosamin (2 - Acetamido - 2 - desoxy - B - D - Glucopyranosyl)
Is = L - Iduronsäure (- pyranosyl)
Gal = D - Galactose (- pyranosyl)

Tabelle I

Bindegewebszellen mit einem entsprechenden Enzymmuster ausgestattet sind und die Versorgung der Fibroblasten mit den Bausteinen der Makromoleküle gewährleistet ist. Nach den Untersuchungen von DELBRÜCK (1, 2) sind die Aktivitäten der Enzyme des Embden - Meyerhof - Zyklus und des Zitronensäure-Zyklus, bezogen auf das Zellprotein, mit denen der Leberzellen vergleichbar. Für einen regen Stoffwechsel der Bindegewebszellen

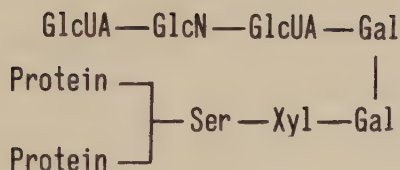
sprechen auch die biologischen Halbwertszeiten der sauren Glycosaminoglycane, die zwischen 3 bis 15 Tagen liegen (3). Die sauren Glycosaminoglycane liegen in der amorphen Grundsubstanz des Bindegewebes nicht in freier Form vor, sondern sind an Proteine kovalent gebunden. Nach MATHEWS (4) ist im Rindernasenknorpel eine zentrale Proteinkette (20% des Gesamtmoleküls) mit etwa 60 Chondroitinsulfatketten verknüpft. Inzwischen konnten auch aus anderen Geweben (Aorta, Cornea, Rippenknorpel) Mucopolysaccharidproteinkomplexe isoliert werden (5-7). Während über den Bindungstyp zwischen Chondroitin-4-Sulfat bzw. Heparin und Protein durch die Arbeiten von RODÉN und LINDAHL (8,9) neue Kenntnisse gewonnen wurden (Abb.1 u.2), ist über die Art der Bindung zwischen Hyaluronat und Protein bisher nichts bekannt.



Bindungstyp von Chondroitin-4-Sulfat an Protein im Rindernasenknorpel (Rodén und Smith)

Abb. 1

Durch die Bindung der sauren Glycosaminoglycane an Proteine gewinnen die Chondroitinsulfate neue Eigenschaften, die im wesentlichen physiko-chemischer Natur sind. So bilden konzentrierte Chondroitinsulfat-Proteinlösungen durch Quer- und Längs- vernetzungen eine dreidimensionale Struktur, sogenannte "random coils" - statistische Knäuel, die in ihrem Inneren durch orientierte Anlagerung Wasser binden und einschließen



Bindungstyp von Heparin an Protein
in der Darmschleimhaut des Schweins
(Lindahl et al.)

Abb. 2

können. Diese starke Hydratation kommt quantitativ durch das hohe effektive hydrodynamische Volumen von Chondroitinsulfat-Protein zum Ausdruck, das nach den Untersuchungen von BUDDECKE et al (5) und FRIMMER und BUDDECKE (10) bis zu 400 ml Wasser/g Substanz betragen kann. In Modelluntersuchungen konnten BUDDECKE et al. (5,10) zeigen, daß die Chondroitinsulfat-Proteinkomplexe auf Grund ihrer makromolekularen Struktur eine wesentliche Bedeutung für Permeabilitätsvorgänge haben. Diese experimentellen Arbeiten lassen daran denken, daß auch im lebenden Organismus den Chondroitinsulfat-Proteinkomplexen - vor allem in den Organen mit hoher Konzentration an diesen Makromolekülen - eine wichtige Funktion für den Substrataustausch zwischen Blutgefäß und Zelle zukommt. Ein ungestörter Ablauf der Transportmechanismen ist jedoch nur dann garantiert, wenn eine intakte Makromolekularstruktur vorliegt, das heißt einerseits Synthese- und Abbauvorgänge im Gleichgewicht stehen, andererseits das "milieu interieur" (Wasserstoffionenkonzentration, Ionenstärke) keine wesentlichen Änderungen aufweist.

Mit der Einführung radioaktiv markierter Substanzen ($^{35}\text{SO}_4$, ^{14}C -Acetat, ^{14}C -Glucose, ^{14}C -Glucosamin, ^{14}C -Leucin, ^{14}C -Serin) war es möglich, durch Messung der Inkorporationsraten einen Einblick in die S y n t h e s e v o r g ä n g e der Chondroitinsulfat-Proteinkomplexe zu gewinnen (9, 11-15), BUDDECKE et al. (16) konnten zeigen, daß eine maximale Diffusionsverzögerung von Glucose bei einer kritischen Konzentration von Chondroitinsulfat-Protein (bis zu 20 mg/ml) in destilliertem Wasser vorliegt. Durch Zugabe steigender Konzentrationen an NaCl (optimal: 0,2 M) fanden sie einen Übergang der Stäbchenform (= Struktur der Chondroitinsulfat-Proteine in destilliertem Wasser) in die Knäuelform. Auf Grund von Aggregatbildung und Dichtezunahme nimmt die Menge an Kristallwasser ab, so daß jetzt mehr für die freie Diffusion der Glucose vorhanden ist. Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration führte ebenfalls zu einer Beeinflussung der Diffusionsraten.

Angaben über A b b a u v o r g ä n g e der sauren Glycosaminoglycane beschränkten sich bisher auf Konzentrationsmessungen ihrer Abbauprodukte in Geweben und Urin (3).

Die Existenz der am Abbau der sauren Glycosaminoglycane beteiligten E n z y m e konnte erstmals von der Arbeitsgruppe um BUDDECKE in der Aorta des Rindes nachgewiesen werden (17 -19).

PROBLEMSTELLUNG

Entsprechende Aktivitätsmessungen in menschlichen Organen lagen bis dahin nicht vor. Wir gingen daher folgenden Fragen nach:

1. Nachweis der am Abbau der sauren Glycosaminoglycane (Hyaluronsäure, Chondroitin, Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat) beteiligten Enzyme: Glycosamino-

glycano-Hydrolasen (Hyaluronidase, β -Glucuronidase, β -Acetylglucosaminidase) in Serum und Organen.

2. Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen
 - in Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen.
 - a) Altersabhängigkeit der Enzyme
 - b) Enzymaktivitäten im Verlauf der Schwangerschaft
3. Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen
 - in Abhängigkeit von pathologischen Bedingungen.
 - Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von
 - a) Arteriosklerose
 - b) Arthrose
 - c) Lebererkrankungen
 - d) Mucopolysaccharidosen

METHODIK

AKTIVITÄTSNACHWEIS DER GLYCOSAMINOGLYCANO - HYDROLASEN

Die Glycosaminoglycano-Hydrolasen: H y a l u r o n i d a s e (systematischer Name: Hyaluronat-Glycanohydrolase, EC 3.2.1.35), β - G l u c u r o n i d a s e (systematischer Name: β -D-Glucuronid-Glucuronohydrolase, EC 3.2.1.31) und β - A c e t y l - g l u c o s a m i n i d a s e (systematischer Name: β -2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosid-Acetamidodesoxyglucohydrolase, EC 3.2.1.30) zählen zu der Gruppe der lysosomalen Enzyme. Durch ihre synergistische Wirkung kommt es zu einer Depolymerisierung langkettiger Glycosaminoglycane zu Disacchariden (Abb.3).

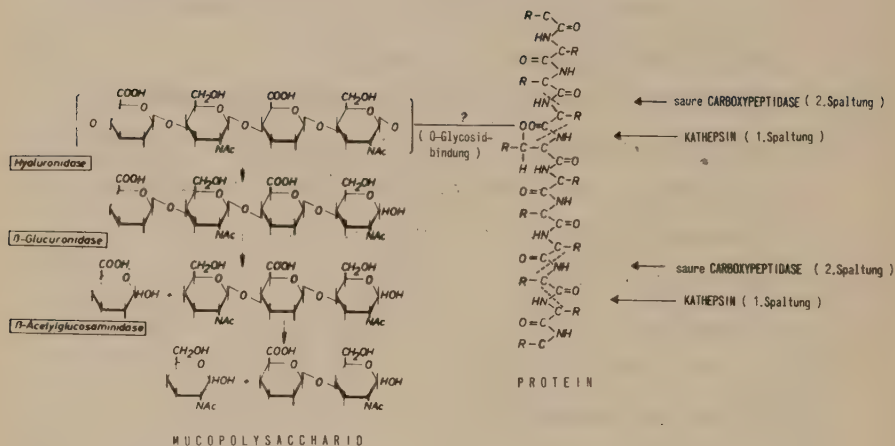


Abb. 3

Wir führten unsere Aktivitätsmessungen im Serum und an Leichenorganen durch, nachdem wir in Vorversuchen an operativ gewonnenem Material und an tierischen Organen durch unterschiedlich lange Lagerung bei verschiedenen Temperaturen zeigen konnten, daß für die Dauer der Lagerung der Leichen kein signifikanter Aktivitätsabfall der Glycosaminoglycano-Hydrolasen eintritt.

(D.PLATT, Blut 15 (1967) 274; D.PLATT, Klin. Wschr. 45 (1967) 92; D.PLATT u. R.HARTMANN, Klin. Wschr. 45 (1967) 998; D.PLATT u. M.DORN, Clin. Chim. Acta, 21 (1968) 333).

Die Messung der Hyaluronidase-Aktivität im Serum wurde durch das Vorliegen eines Inhibitors (20) erschwert. Nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung war jedoch der Aktivitätsnachweis in der 0 - 35 Gew.-%-Fraktion möglich. Die Bestimmung der β-Glucuronidase und β-Acetylglucosaminidase-Aktivität wurde direkt im Serum vorgenommen.

Die Aufarbeitung der Organe erfolgte nach der bei PLATT und HARTMANN (Klin.Wschr.45 (1967) 998 beschriebenen Methode.

Die Aktivitätsmessungen wurden in Homogenatüberständen, in fraktionierten Ammoniumsulfatfällungen und nach säulenchromatographischer Reinigung durchgeführt. Die Hyaluronidase-Aktivität wurde durch Messung der freigesetzten N-Acetylglucosamin-Endgruppe bestimmt (21). Als Substrat diente Hyaluronat. Da durch die Anwesenheit der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase in Homogenaten und Ammoniumsulfatfällungen eine weitere Spaltung der durch die Hyaluronidase-Wirkung entstandenen Tetrasaccharide erfolgt, sind exakte Angaben der Hyaluronidase-Aktivität erst nach einer säulenchromatographischen Reinigung möglich (E.BUDDECKE und D. PLATT, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem., 343 (1965) 61).

In unseren Untersuchungen wurde daher - je nach Fragestellung - die Hyaluronidase-Aktivität in E_{546} nm/mg Protein/Inkubationszeit angegeben.

Zur Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität wurde als Substrat Phenolphthalein- β -Glucuronid verwandt. Das freigesetzte Phenolphthalein wurde bei 546 nm bei alkalischem p_H -Wert kolorimetrisch bestimmt (22).

Die Bestimmung der β -Acetylglucosaminidase-Aktivität erfolgte an dem Substrat β -Phenyl-N-Acetyl-D-glucosaminid durch colorimetrische Messung der freigesetzten Aglycone (23).

Die Aktivitäten für die β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase wurde in mU angegeben (1 mU = μ mol freigesetztes Phenolphthalein bzw. Phenol pro mg Protein/min bei 37°C).

ERGEBNISSE

NACHWEIS DER GLYCOSAMINOGLYCANO-HYDROLASEN-AKTIVITÄTEN IN SERUM UND ORGANEN.

Serum-Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen in gleichen Proben lagen bei gesunden Probanden bis dahin nicht vor. In 200 Seren klinisch gesunder Männer und Frauen wurden daher die Aktivitäten der Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase gemessen. Die Probanden wurden in 6 Altersgruppen eingeteilt. Alle drei lysosomalen Enzyme zeigten von der ersten (0 - 1 Jahr) zur 2. Altersgruppe (1- 15 Jahre) einen signifikanten Aktivitätsabfall. Während die Hyaluronidase in den folgenden Altersgruppen (bis zum 80. Lebensjahr) in einem gewissen Streubereich konstante Aktivitäten aufwies, stiegen die β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivitäten bis zum 80. Lebensjahr an (D.PLATT, Blut 15 (1967) 274).

In 13 - makroskopisch unauffälligen - Leichenorganen wurde die Aktivität der Hyaluronidase, in 14 Organen wurden die Aktivitäten der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase bestimmt. Um eine Information über den Abbau der kovalent an die Glycosaminoglycane gebundenen Proteinkomponente zu gewinnen, wurden außerdem in 12 Organen die Aktivitäten der sauren Carboxypeptidase (EC3.4.2....) und in 9 Organen die bei $p_H:3,2$ optimal Hämoglobin spaltende Kathepsin (EC 3.4.4.23) - Aktivität gemessen. (D.PLATT u. U. STEIN, Z.klin.Chem. u. Biochem. 7 (1969) 374).

Nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurden die höchsten Aktivitäten für alle untersuchten Enzyme - mit Ausnahme des Kathepsins - in der 11 - 30 Gew.-%-Fraktion gefunden. Über 60% der Kathepsin-Aktivität fand sich in der 31-50 Gew.-%-Fraktion. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der untersuchten Organe erfolgte daher in diesen Fraktionen. Die Glycosaminoglycanohydrolasen Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase zeigten die höchsten Aktivitäten in den Organen des r e t i k u l o - h i s t i o z y t ä r e n Systems (RHS): Leber, Milz und Thymus. Auffällig sind die hohen Aktivitäten der β -Acetylglucosaminidase, der sauren Carboxypeptidase und des Kathepsins in der Nebenniere. Die dritthöchste Carboxypeptidase-Aktivität wurde in der Hypophyse gemessen und lag etwa doppelt so hoch wie in der Leber. Geringe Aktivitäten aller untersuchten Enzyme zeigten die Organe: Gehirn, Herz und subkutanes Bindegewebe. Über die biologische Bedeutung der hohen Glycosaminoglycano-Hydrolasenaktivitäten in den Organen des RHS läßt sich z.Zt. ebenso wenig sagen, wie über die hohen Aktivitäten der β -Acetylglucosaminidase, der sauren Carboxypeptidase und des Kathepsins in der Nebenniere.

AKTIVITÄTSMESSUNGEN DER GLYCOSAMINOGLYCANO-HYDROLASEN IN ABHÄNGIGKEIT VON PHYSIOLOGISCHEN UND PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.

Nachdem die Existenz der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im Serum und in zahlreichen gesunden Organen nachgewiesen werden konnte, sollten weitere Untersuchungen Auskunft darüber geben, ob morphologisch veränderte Organsysteme gleichzeitig

eine Änderung in der Höhe der Enzymaktivitäten erkennen lassen. Für Studien des Interzellularstoffwechsels sind vor allem Organe mit einem hohen Gehalt an sauren Glycosaminoglycanen und Skleroproteiden von Interesse, wie hyaliner Knorpel und Gefäße. Beide Organe weisen sowohl altersbedingte als auch degenerative Veränderungen auf.

Auf Grund morphologischer und biochemischer Studien sind Veränderungen des Bindegewebes im Verlauf der Schwangerschaft und bei Lebererkrankungen bekannt. Ein besonderes interessantes Modell zum Studium des katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsels stellt die Gruppe der Mucopolysaccharidosen dar, bei der es durch eine spezifische Störung im Stoffwechsel der Mucopolysaccharide zu einer hochgradigen Ablagerung saurer Glycosaminoglycane in der Mehrzahl der Organe kommt.

Untersuchungen am hyalinen Knorpel. An 120 Knorpelproben (60 Rippen- und 60 Kniegelenkknorpelproben) die aus einem unausgewählten Sektionsgut stammen, wurden - nach einer Einteilung in 6 Altersklassen - die Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen in Abhängigkeit von Alter und arthrotischen Veränderungen gemessen.

Da im Knorpelgewebe die interzellulär gelegenen Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe einen großen Raum einnehmen, wurde zur exakten Erfassung der Stoffwechselleistung der Chondrozyten der DNS-Gehalt bestimmt, um neben dem Proteingehalt ein weiteres Bezugssystem für die Aktivitätsangabe zur Verfügung zu haben. Eine Messung des Proteingehaltes in Knorpelhomogenatüberständen erlaubt keine Aussage über die Lokalisation

des Proteins, d.h. ob es sich um intrazelluläre oder extrazelluläre Eiweißkörper handelt. Jede Vermehrung des extrazellulären Proteinanteils bei konstanter Zellzahl führt aber zu einer Verminderung der wahren Enzymaktivitäten, falls diese auf Proteinkonzentration bezogen werden. Die Bedeutung der DNS-Bestimmung für die Angabe der Enzymaktivitäten geht aus den Ergebnissen hervor. So nimmt mit steigendem Alter die Proteinkonzentration im hyalinen Knorpel zu, während der DNS-Gehalt im entsprechenden Zeitraum bis zu 70% abnimmt. Hieraus lassen sich die unterschiedlichen Aktivitäten in beiden Bezugssystemen erklären (D.PIATT u.M.DORN, Z.ges.exp. Med.147 (1968) 253).

Der Nachweis von Hyaluronidase - Aktivität konnte mit den üblichen Anreicherungsverfahren, wie Citratfällung, Ammoniumsulfatfällung sowie säulenchromatographischer Reinigung, in keiner der untersuchten Knorpelproben erbracht werden. Jedoch wurde durch Zugabe von gereinigten Knorpelgewebsextrakten der Abbau von Hyaluronat durch hochgereinigte Hodenhyaluronidase um etwa 80% gehemmt. Dieser Hemmeffekt war auch noch nach einer Erhitzung auf 80°C für 20 Minuten nachweisbar. Auf Grund der hohen Konzentration von Mucopolysaccharidproteinkomplexen im hyalinen Knorpel war es naheliegend, an eine kompetitive Hemmung zu denken. Aus der Darstellung nach LINEWEAVER - BURK (Abb.4), in der die Hyaluronidase-Aktivitäten bei abgestufter Substratkonzentration und gleichbleibender "Inhibitor"-Menge aufgezeichnet sind, geht hervor, daß die "scheinbare Michaelis-Konstante" K im gehemmten Substratumsatz gegenüber dem K_M -Wert der ungehemmten Hyaluronathydrolyse vergrößert ist. Da die

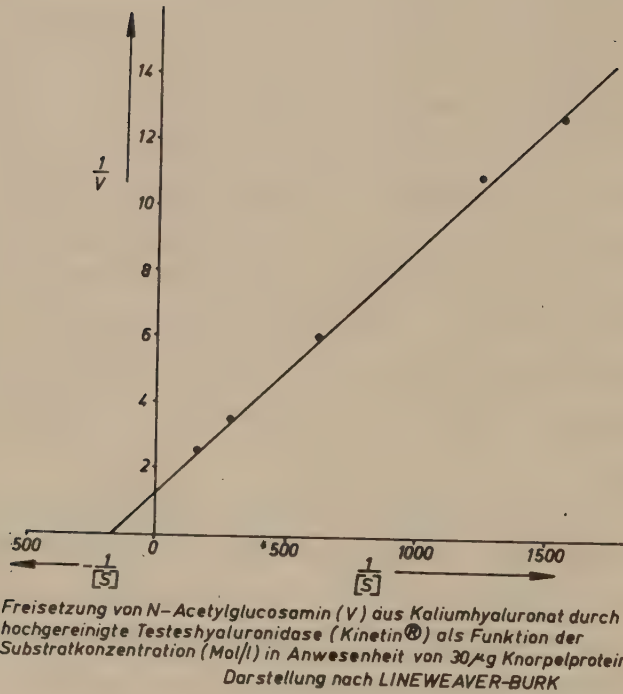


Abb. 4

(siehe auch D.PLATT und M.DORN, Clin.Chim.Acta 21 (1968) 333)

erreichbare Maximalgeschwindigkeit im Inhibitionsansatz dagegen erniedrigt ist, muß die Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität als nicht kompetitiv angesehen werden (24, 25). Unter der Vorstellung, daß der Inhibitor im Interzellularraum zu finden sei, versuchten wir durch Isolierung der Knorpelzellen, Aktivitätsmessungen in den isolierten Chondrozyten durchzuführen (D.PLATT u.M.DORN, unveröffentlichte Ergebnisse). Nach Untersuchungen von SOKOLOFF et al.(26) besteht 90% des Knorpelproteins

aus Kollagen. Es erschien daher sinnvoll, durch Inkubation des Knorpelgewebes (50 μ dicke Gefrierschnitte) mit Kollagenase die Chondrozyten aus der Matrix zu isolieren. Mithilfe dieser Methode war es erstmals möglich, Hyaluronidase-Aktivität im hyalinen Knorpel nachzuweisen. Die Höhe der Enzymaktivität entspricht der in Leberhomogenatüberständen.

β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivitäten waren schon in Homogenatüberständen meßbar. Dabei zeigten beide Enzyme signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Herkunft (Rippenknorpel bzw. Kniegelenkknorpel), vom Alter und von arthrotischen Veränderungen. So lagen die Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im Rippenknorpel niedriger als im Kniegelenkknorpel. Mit zunehmendem Alter fielen die Aktivitäten der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase im Rippenknorpel in beiden Bezugssystemen (Proteinkonzentration bzw. DNS-Gehalt) signifikant ab. Im Kniegelenkknorpel dagegen zeigten sich deutliche Aktivitätsunterschiede in Abhängigkeit vom Bezugssystem. Bezogen auf den Proteingehalt fand sich von der Geburt bis zum 80. Lebensjahr ein signifikanter Aktivitätsabfall für beide Enzyme. Unter Berücksichtigung des DNS-Gehalts konnte jedoch gezeigt werden, daß die β -Acetylglucosaminidase - in einem gewissen Schwankungsbereich - während des gesamten Lebens konstant bleibt, die β -Glucuronidase sogar einen signifikanten Aktivitätsanstieg im arthrotischen Gelenkknorpel aufweist (D. PLATT u. M. DORN, Z. ges. exp. Med. 147 (1968) 251).

In einer nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und anschließender saulelektrophoretischer Trennung an Sephadex G - 100 gereinigter Fraktion wurden pH -Optimum,

Temperaturoptimum und Michaelis-Konstanten bestimmt. Die p_H -Optima liegen für beide Glycosaminoglycano-Hydrolasen, wie es für lysosomale Enzyme typisch ist, im sauren Bereich. Die Michaelis-Konstanten entsprechen den in früheren Untersuchungen an der Aortenwand des Rindes gemessenen Werten (17, 19), (D.PLATT u. M.DORN, Clin.Chim.Acta, 21 (1968), 333).

U n t e r s u c h u n g e n a n A o r t e n , F e m o r a l - a r t e r i e n u n d F e m o r a l v e n e n . Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen wurden in 150 Aorten, 65 Femoralarterien und 40 Femoralvenen durchgeführt. Die Einteilung der Gefäße erfolgte zunächst nach makroskopischer Beurteilung in 4 Stadien arteriosklerotischer Veränderungen. Gleichzeitig wurde eine Einteilung in 4 Altersklassen vorgenommen. Da bei alleiniger makroskopischer Beurteilung der Zustand der Gefäße ungenau bestimmbar ist (D.PLATT, G.BENEKE u.E.BUDDECKE, Klin. Wschr. 45 (1967) 542), wurden sämtliche Stadien lichtmikroskopisch und die Veränderungen der Aortenwand zusätzlich elektronenmikroskopisch kontrolliert (D.PLATT u. B.SCHNORR, Klin.Wschr., in Druck).

Während in früheren Untersuchungen (D.PLATT, Klin.Wschr. 45 (1967) 92) die Aktivitätsmessungen an der gesamten Aorta thoracica - nach den überwiegenden arteriosklerotischen Veränderungen klassifiziert - durchgeführt wurden, erfolgten die Aktivitätsmessungen in den folgenden Arbeiten (D.PLATT u.H.P. LUBOEINSKI, Z.Gerontol. 2 (1969) 17; D.PLATT u.H.P. LUBOEINSKI, Angiologica 6 (1969) 19) an vergleichbaren Stadien der gleichen Aorta. Die Enzymaktivitätsmessungen in den peripheren Gefäßen wurden jedoch wegen des geringen Ausgangsmaterials

am gesamten Gefäß durchgeführt (D.PLATT u.D. PERNICE, Z.Geron-
tol. 2 (1969) 150). Hyaluronidase-Aktivität war in Homogenat-
überständen nur gering nachweisbar. Erst nach einer fraktionier-
ten Ammoniumsulfatfällung und einer anschließenden säulenchro-
matographischen Reinigung konnten exakte Hyaluronidase-Akti-
vitäten gemessen werden (s. auch E.BUDDECKE u.D.PLATT, Hoppe-
Seyler's Z. Physiol. Chem. 343 (1965) 61).

Um die Beeinflussbarkeit der Glycosaminoglycano-Hydrolasen-Ak-
tivitäten durch altersbedingte und arteriosklerotische Umbau-
vorgänge zu erfassen, waren vergleichende Aktivitätsmessungen
in identischen Medien Voraussetzung. Wegen der niedrigen Hya-
luronidase-Aktivität in Homogenatüberständen wurde daher für
diese Fragestellung lediglich das Aktivitätsverhalten der
 β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase untersucht.

Die Enzymaktivitätsmessungen in menschlichen Aorten und Femoral-
gefäßen - in Abhängigkeit vom Alter - erfolgte in unveränder-
ten Bezirken. In der Aortenwand zeigte die β -Glucuronidase
bis zum 60. Lebensjahr konstante Aktivitäten, oberhalb des
60. Lebensjahres fand sich ein signifikanter Aktivitätsan-
stieg; die Aktivitäten der β -Acetylglucosaminidase wiesen
während des ganzen Lebens keine signifikanten Änderungen auf.

In den Femoralarterien zeigten beide Glycosaminoglycano-Hy-
drolasen von der Geburt bis zum 80. Lebensjahr - in einem
gewissen Schwankungsbereich - konstante Aktivitäten. Die
Femoralvenen wiesen höhere spezifische Enzymaktivitäten auf
als die entsprechenden Arterien, ließen aber ebenso in Ab-
hängigkeit vom Alter keine signifikanten Aktivitätsverän-
derungen erkennen.

In sämtlichen Gefäßen waren die Aktivitäten der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase hochsignifikant korreliert. Indem die Einzymaktivitäten gleichzeitig auf den DNS-Gehalt bezogen wurden, konnte gezeigt werden, daß die einzelne Gefäßwandzelle während des Lebens gleiche Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen aufweist. Damit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob mit zunehmendem Alter die eine oder andere Zellart zu- oder abnimmt, da der DNS-Gehalt nur einen summarischen Wert aller Zellen darstellt (D.PLATT, Mediz. Klinik, 64 (1969) 1261; D.PLATT u.H.P. LUBOEINSKI, Z.Gerontol. 2 (1969) 17; D.PLATT u. D.PERNICE, Z.Gerontol. 2 (1969) 150).

Mit zunehmendem Alter nehmen bekanntlich, wie auch aus unseren Untersuchungen hervorgeht, die arteriosklerotischen Umbauvorgänge der Gefäßwand zu. Von großem Interesse war es daher, der Frage nachzugehen, ob neben den morphologischen Gefäßwandveränderungen, die deutlich von den altersbedingten Veränderungen zu unterscheiden sind, Abweichungen im Gefäßwandstoffwechsel auftreten. Um eine genügende Menge an Ausgangsmaterial für die Enzymaktivitätsmessungen in der Aortenwand zur Verfügung zu haben, wurden identische Stadien der gleichen Aorta zusammengegeben und nach der bei PLATT und LUBOEINSKI (Angiologica 6 (1969) 19) beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Ergebnisse zeigten, daß es mit zunehmenden Umbauprozessen der Gefäßwand zu signifikanten Aktivitätssteigerungen der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase kommt. Die gleichen Ergebnisse konnten auch in den Femoralarterien erhoben werden. Von wesentlicher Bedeutung erscheint uns jedoch der folgende Befund: Bestimmt man in u n v e r - ä n d e r t e n Gefäßwandbezirken die Aktivitäten der

Glycosaminoglycano-Hydrolasen und setzt sie in Beziehung zu den arteriosklerotischen Veränderungen der Restaorta, so findet man signifikante bis hochsignifikante Aktivitätsunterschiede in Abhängigkeit vom Grad arteriosklerotischer Veränderungen (ausgedrückt in Gew.%). Weist die Aorta thoracica weniger als 10 Gew.% Lipoidoseherde auf, so kommt es in den unveränderten Bezirken zu einem hochsignifikanten Abfall der β -Glucuronidase und zu einem signifikanten Abfall der β -Acetylglucosaminidase-Aktivität. Nehmen dagegen die arteriosklerotischen Wandveränderungen mehr als 10 Gew.% ein, so weisen beide Enzyme in den unveränderten Bezirken wieder einen signifikanten Aktivitätsanstieg auf (D.PLATT u.H.P. LUBOEWSKI, *Angiologica* 6 (1969) 19).

Aktivitätsmessungen im Verlaufe der Schwangerschaft. Mit der hormonellen Umstellung während der Schwangerschaft kommt es zu charakteristischen Veränderungen des Bindegewebes, die sich nicht nur auf die sogenannten "steroid sensitive" oder "target" - Gewebe - Uterus, Vagina, Sexualhaut - beschränken, sondern auch die Symphyse, die Ileosacralgelenke, das parametranale Bindegewebe, ja sogar die Darmwand und das Nierenbecken betreffen. In biochemischen Analysen wurde vor allem das Verhalten der Mucopolysaccharide während der Schwangerschaft untersucht (27,28). Mittels radioaktiv markiertem $^{35}\text{SO}_4$ konnte gezeigt werden, daß Oestrogen die Synthese der sauren Glycosaminoglycane im Epithel der Cervix uteri steigert (29). Untersuchungen des katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsels lagen bis dahin jedoch nicht vor, so daß die Serum-Akti-

vitätsbestimmungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen gerechtfertigt erschienen, zumal es praktisch unmöglich ist, direkte Aktivitätsmessungen im Gewebe von Uterus und Vagina durchzuführen. Die Aktivitätsmessungen wurden in 260 Seren, im Verlauf der Schwangerschaft, während des Wochenbetts und im Nabelvenenserum durchgeführt (D.PLATT u. M.PLATT, Klin. Wschr. 46 (1968) 768; D.PLATT u.M.PLATT, Gynaecologia 167 (1969)). Alle 3 Enzyme zeigten bis zur Geburt einen signifikanten Aktivitätsanstieg, im Verlaufe des Wochenbetts einen signifikanten Abfall der Aktivität. Im Nabelvenenserum lagen die Hyaluronidase-, β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivitäten um 60 bzw. 85 und 70% niedriger als direkt vor der Geburt.

Die signifikanten Aktivitätsänderungen aller 3 lysosomalen Enzyme während der Schwangerschaft und im Verlauf des Wochenbetts könnten durch 2 Mechanismen bedingt sein:

1. Eine vermehrte Ausschwemmung der Glycosaminoglycano-Hydrolasen aus der Placenta,
2. eine durch Oestrogen bedingte Freisetzung der Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase aus den Lysosomen der übrigen Organe.

Aktivitätsmessungen in Placenten, Eihäuten und Nabelschnüren haben gezeigt, daß Placenta und Eihäute hohe spezifische Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen aufweisen (D.PLATT und M.PLATT, Zbl. Gynaecol. 91 (1969) 673). So entsprechen die β -Glucuronidase-Aktivitäten in den Eihäuten denen in der Leber, während die β -Acetylglucosaminidase sogar dreifach höhere Aktivitäten aufweist als in der Leber.

Um die Frage einer oestrogenbedingten Freisetzung der Enzyme

aus den Lysosomen der übrigen Organe zu beantworten, wurden entsprechende tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt. An männlichen orchidektomierten und weiblichen Ratten wurden nach Gabe von Oestradiolbenzoat s.c., die Aktivitäten der β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase in der Leber gemessen, da dieses Organ - nach unseren früheren Untersuchungen - hohe spezifische Glycosaminoglycano-Hydrolasen-Aktivitäten aufweist. Da für diese Fragestellung das Verhältnis der gebundenen lysosomalen zur freien Aktivität bestimmt werden mußte, wurden die Lysosomen in Anlehnung an das bei der DUVE (30) beschriebene Verfahren präpariert. Aus den Ergebnissen geht hervor (Abb.5), daß die β -Glucuronidase einen hochsignifikanten, die β -Acetylglucosaminidase einen signifikanten Anstieg der gebundenen Aktivität aufweist, während bei beiden Enzymen für die freie Aktivität keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren gefunden wurden. (D.PLATT u.H.GLAUM, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse zeigen einmal, daß es unter Oestrogen zu einer signifikanten Steigerung der gebundenen Enzymaktivitäten kommt. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte einerseits darin begründet sein, daß unter Oestrogenbelastung eine Erhöhung der Proteinsynthese vorliegt. Zum anderen wäre daran zu denken, daß Oestrogen labilisierend auf lysosomale Membranen wirkt (41) und als Folge davon eine kompensatorische Neusynthese von lysosomalen Enzymen ausgelöst wird. Andererseits könnten die Ergebnisse ein Hinweis dafür sein, daß die während der Schwangerschaft gesteigerten Serum-Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen aus Placenta und Eihäuten stammen.

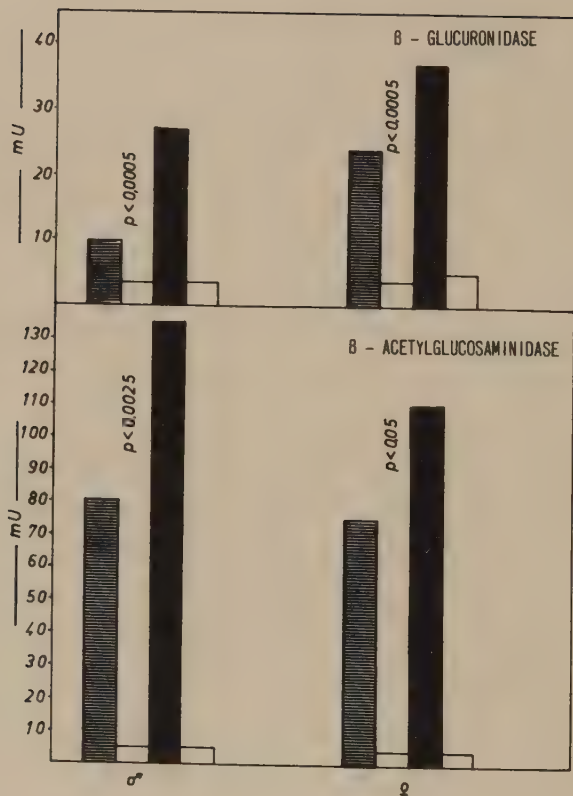


Abb. 5

(Bestimmung der gebundenen- und freien lysosomalen Aktivität der Rattenleber nach Gabe von Oestradiolbenzoat s.c., 350 µg/Tag für 3 Wochen.

▨ gebundene Aktivität; □ freie Aktivität der Kontrolltiere
 ■ gebundene Aktivität; □ freie Aktivität der Versuchstiere

Aktivitätsmessungen bei Lebererkrankungen. Auf Grund der morphologischen Veränderungen bei akuter und chronischer Hepatitis sowie bei Lebercirrhose, bei deren Entstehung dem Mesenchym eine zentrale Stellung zukommt, und der biochemischen Substratanalysen und Synthesestudien der Interzellulärsubstanz in den einzelnen Stadien der Leberveränderungen (31 - 33) erschien es uns sinnvoll, einen Einblick in den katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel zu gewinnen. Als Parameter für die Stoffwechselvorgänge in der Leber wählten wir die Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im Serum. Diese Aktivitätsmessungen sollten außerdem dazu dienen, neben den routinemäßig durchgeführten Serumaktivitätsmessungen der Glutamat-Oxalacetat- und Glutamat-Pyruvat-Transaminasen sowie der alkalischen Phosphatase und Lactat-Dehydrogenase evtl. weitere Indikatoren für die Stoffwechselveränderungen in der pathologisch veränderten Leber zu liefern.

Die Aktivitäten der Glycosaminoglycano-Hydrolasen wurden in 200 Seren von Patienten mit akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose untersucht. Außerdem wurden die Aktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, alkalischen Phosphatase und Lactat-Dehydrogenase gemessen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivitäten der Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase in allen Stadien der Lebererkrankungen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht sind. In den einzelnen Stadien der Lebererkrankungen weisen die Glycosaminoglycano-Hydrolasen jedoch ein unterschiedliches Aktivitätsverhalten auf. Ein Vergleich der Hyaluronidase-Aktivität zwischen

akuter und chronischer Hepatitis läßt im chronischen Stadium einen hochsignifikanten Aktivitätsabfall erkennen, der bis zum Stadium der Lebercirrhose konstant bleibt. Während die β -Glucuronidase im akuten und chronischen Stadium gleiche Aktivitäten aufweist, fällt die β -Acetylglucosaminidase-Aktivität bei der chronischen Hepatitis signifikant ab. Beide Enzyme zeigen jedoch im Stadium der Lebercirrhose wieder einen hochsignifikanten Aktivitätsanstieg. Die Glycosaminoglycano-Hydrolasen weisen untereinander ein signifikantes Korrelationsverhalten auf, es findet sich jedoch keine Korrelation zu den Serum-Transaminasen, der alkalischen Phosphatase und der Lactat-Dehydrogenase (D.PLATT u.B.LEINWEBER, Acta hepato splenol., 16(1969)324. Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen in Leberstanzzy lindern (D.PLATT u. B.LEINWEBER, unveröffentlichte Ergebnisse) können die im Serum gewonnenen Befunde bestätigen.

Aktivitätsmessungen bei Mucopolysaccharidosen. Die Mucopolysaccharidosen stellen eine Krankheitsgruppe dar, die durch eine vermehrte Ablagerung saurer Glycosaminoglycane und durch eine gesteigerte Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin gekennzeichnet sind. Eine vermehrte Ablagerung saurer Glycosaminoglycane kann einmal bedingt sein durch eine gesteigerte Synthese - bei konstantem oder sogar vermindertem Abbau - oder durch einen verminderten Abbau bei unveränderter Synthese. Durch die qualitativen Unterschiede der Mucopolysaccharidausscheidung konnten bisher 6 verschiedene Typen differenziert werden. An 3 Fällen von Mucopolysaccharidosen, die durch Harn-

analysen typisiert wurden, sollte durch Serumaktivitätsmessungen der den Abbau der sauren Glycosaminoglycane katalysierenden Enzyme gezeigt werden, ob eine Aktivitätsminderung der Glycosaminoglycano-Hydrolasen vorliegt. Die Ergebnisse zeigen, daß alle 3 Enzyme gesteigerte Aktivitäten aufweisen (D.PLATT u. Fr. KOCH, Klin. Wschr. 47 (1969) 888).

S C H L U S S B E M E R K U N G E N

Durch die grundlegenden Arbeiten von de DUVE, NOVIKOFF, BEAUFAY u.a. (34, 35) konnte mit Hilfe elektronenoptischer und biochemischer Methoden neben den bis dahin bekannten klassischen Zellfraktionen: Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen (= Teile des endoplasmatischen Reticulums) und Zytoplasma eine neue Gruppe subzellulärer Partikel, die L Y S O S O M E N, nachgewiesen werden. Diese Partikel mit einem Durchmesser von 0,25 - 0,50 μ sind von einer einfachen Membran umgeben. Eingehendere biochemische Analysen haben ergeben, daß die Lyso-somen mit einer Reihe hydrolytischer Enzyme ausgestattet sind, die gemeinsame Eigenschaften aufweisen. So handelt es sich ausschließlich um Enzyme, die Substrate mit unterschiedlichem Molekulargewicht unter Wasseraufnahme in kleinere Bruchstücke zerlegen. Das pH-Optimum liegt - mit Ausnahme der Kollagenase (D.PLATT, Z. ges. exp. Med. 150 (1969) 185) - im sauren pH-Bereich zwischen pH: 3,5 - 6. Unter den in Tabelle II aufgeführten, bisher bekannten Enzymen finden sich 2 Gruppen, die den Abbau der Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe katalysieren. So spalten die Glycosaminoglycano-Hydrolasen: Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase durch

ENZYME	EC*
RIBONUCLEASE	2.7.7.16
	2.7.7.17
saure PHOSPHATASE	3.1.3.2
PHOSPHOPROTEIN - PHOSPHATASE	3.1.3.16
DESOXYRIBONUCLEASE	3.1.4.5
ARYLSULFATASE	3.1.6.1
LYSOZYM	3.2.1.17
α - GLUCOSIDASE	3.2.1.20
β - GALACTOSIDASE	3.2.1.23
α - MANNOSIDASE	3.2.1.24
β - ACETYLGLUCOS - AMINIDASE	3.2.1.30
β - GLUCURONIDASE	3.2.1.31
HYALURONIDASE	3.2.1.35
KATHEPSIN D	3.4.4.23
KOLLAGENASE	3.4.4....
saure ESTERASE	?

Tabelle II: LYSOSOMALE ENZYME (* EC = Gruppe 3
nach dem Vorschlag der Internationalen
Enzym - Kommission)

sukzessive Wirkung die Mucopolysaccharid-Komponente über
dimere Disaccharide zu Disacchariden, während der Protein-
anteil durch Kathepsin abgebaut wird. Die Mucopolysaccharid-
Proteinkomplexe stellen zusammen mit den Skleroproteiden
Kollagen und Elastin die Struktursubstanzen des Bindegewebes
dar. Während die Synthese, bis zu den hochmolekularen Grund-
bausteinen, intrazellulär stattfindet, ist die

Extrazellularraum erfolgen, da es unwahrscheinlich erscheint, daß die makromolekularen Substanzen - die fest im Interzellularraum verankert sind - wieder in die Zelle gelangen. Damit kommt aber der Regulierung der Enzymfreisetzung aus den Lysosomen eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der Mucopolysaccharid-Protein-Struktur zu.

Die Regulation kann nun einmal über eine Änderung der Permeabilität der Lysosomenmembran wirken, zum anderen an den Enzymen selbst angreifen.

Eine Membran - stabilisierende Wirkung ist u.a. für die Glucocorticoide bekannt (36,37). Daneben führen zahlreiche Pharmaka zu einer Stabilisierung der Lysosomenmembran (37). In eigenen Untersuchungen (E.BUDDECKE u. D.PLATT, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 343 (1965) 61; D.PLATT, Arzneim.Forsch. 19 (1969) 143) konnten wir zeigen, daß sowohl körpereigene als auch synthetische Substrate in der Lage sind, den Abbau von Glycosaminoglycanen durch Hemmung des Starterenzym Hyaluronidase zu beeinflussen.

Eine Labilisierung der Lysosomenmembran - und damit eine vermehrte Freisetzung der Enzyme - findet man bei O_2 -Mangel, im sauren pH-Bereich, durch Substanzen wie Vitamin A, Ascorbinsäure, L-Thyroxin, Östradiol, Cystin u.a. (41).

Kontrollsysteme sind natürlich in den Organen von besonderer Bedeutung, die einen hohen Gehalt an Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen aufweisen und in denen den Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen auf Grund ihrer Makromolekularstruktur eine bedeutende Funktion im Substrataustausch zwischen Blutgefäßsystem und Zelle zukommt. Besonders interessant sind vor allem die Organsysteme, die durch Diffusion ernährt werden, wie

der hyaline Knorpel und die inneren Anteile der Aortenwand. Im hyalinen Knorpel liegen die Chondrozyten eingebettet in den von ihnen synthetisierten Skleroproteiden und Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen. Auf Grund physiko-chemischer Untersuchungen wurde für die Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe eine Porengröße von etwa 50 Å berechnet (38). Somit können - bei einer intakten Molekularstruktur - nur Substrate bestimmter Molekülgröße, wie Aminosäuren, Fettsäuren, Glucose, O₂ und Elektrolyte praktisch ungehindert die Chondrozyten erreichen und zur Erhaltung des Eigenstoffwechsels oder zur Synthese der Skleroproteide verwandt werden. Größere Moleküle, wie Albumine, Globuline und Fibrin werden an der Passage gehindert. Störungen der "Molekularsieb" können sowohl Synthese - als auch Abbauschritte betreffen. Aus den Untersuchungen von BUDDECKE, HILZ, GREILING et al. (5, 6, 7, 11) geht hervor, daß die Synthese der Mucopolysaccharid- und Proteinkomponente gekoppelt ist. Die Störungen im Aufbau der Makromoleküle können also vielfältiger Art sein. Änderungen im katabolen Mucopolysaccharid-Proteinstoffwechsel vermögen ebenfalls den Mucopolysaccharid-Anteil, wie auch die Proteinkomponente zu beeinflussen.

BUDDECKE et al (39), die das Verhalten Chondroitin-4-Sulfat-Protein-abbauender Enzyme in der Aorta thoracica des Rindes untersuchten, fanden Hinweise für eine synergistische Wirkung der Glycosaminoglycano-Hydrolasen.

Alle diese Enzymaktivitätsmessungen in Organen stellen jedoch, ebenso wie die in den vorliegenden Untersuchungen, Messungen der gebundenen + freien Aktivität dar. Von ausschlaggebender Bedeutung ist aber allein diejenige Enzymmenge, die nach dem

Austritt aus den Lysosomen in den Extrazellularraum gelangt und die hier liegenden Substrate abbaut, d.h. die freie Aktivität. So kann einmal bei konstanter Gesamtaktivität (gebundene + freie Aktivität) durchaus ein gesteigerter Abbau stattfinden, falls der freie, wirksame Enzymanteil erhöht ist. Zum anderen ist bei einer gesteigerten Gesamtaktivität eine unveränderte Abbaurate zu erwarten, wenn die freie Enzymmenge konstant bleibt.

Eine Erhöhung der freien Aktivität bei pathologischen Ergebnissen könnte außerdem durch eine gesteigerte Phagozytose bzw. Pinozytose indirekt ausgelöst werden. Dabei wäre folgender Mechanismus zu diskutieren: Gesteigerte Phagozytose bzw. Pinozytose in Zellen des RHS führt zur Bildung von Phagosomen (Sekundärlysosomen). Diese Organellen sind gegenüber Primärlysosomen vergrößert und besitzen gleichzeitig eine labilere Membran. Bei der mechanischen Aufarbeitung des Gewebes können Phagosomen vermehrt zerstört werden, so daß eine erhöhte extrazelluläre freie Aktivität vorgetäuscht wird, die "in vivo" nicht existiert (42,50).

Eine getrennte Bestimmung der gebundenen und freien Aktivität ist jedoch nur nach Präparation der Lysosomen aus frisch gewonnenem Untersuchungsmaterial möglich, da durch eine längere Lagerung der Organe, infolge einer gesteigerten Durchlässigkeit der Lysosomenmembran, das Verhältnis gebundener - zur freien Aktivität zugunsten der freien Aktivität verschoben wird. Physiologischerweise liegt der größte Anteil der Enzyme in gebundener Form vor (40, 41, 42, D.PLATT u.H.GLAUM, unveröffentlichte Ergebnisse). Kommt es jedoch einmal zu einer

Störung in der geregelten Freisetzung lysosomaler Enzyme, so kann als weiterer Regulationsmechanismus die Anwesenheit von Enzym - I n h i b i t o r e n im Extrazellulärraum angesehen werden.

Für das Vorliegen eines solchen Schutzmechanismus sprechen unsere Aktivitätsmessungen der Hyaluronidase. So konnte in Homogenatüberständen des hyalinen Knorpels, ja sogar nach zahlreichen Reinigungsschritten keine Hyaluronidase-Aktivität gemessen werden, jedoch war eine Inhibitorwirkung des hyalinen Knorpels gegenüber der Hyaluronidase nachweisbar. Da die Hyaluronidase den Abbau der Mucopolysaccharide startet würde eine unkontrollierte Freisetzung des Enzyms zu einer Depolymerisierung der sauren Glycosaminoglycane und damit zu einem Zusammenbruch der Knorpelmatrix-Struktur führen. Das Vorliegen eines Hyaluronidase-Inhibitorsystems ist daher sinnvoll. Der Existenznachweis der Hyaluronidase nach Kollagenase - Vorbehandlung und die Inhibitor-Versuche sprechen dafür, daß es sich bei dem Inhibitor um eine Kollagen-Fraktion handeln dürfte (D.PLATT u.M.DORN, in Arbeit). In den Gefäßwänden waren in Homogenatüberständen Hyaluronidase-Aktivitäten ebenfalls nur gering nachweisbar. Bekanntlich ist aber die Gefäßwand reich an Kollagen und Dermatan-sulfat. Beide Substrate könnten also über einen Inhibitoreffekt den Aktivitätsnachweis der Hyaluronidase erschweren (s. auch E.BUDDECKE u. D.PLATT, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 343 (1965) 61).

Während Aktivitätsmessungen im Serum den Anteil der freigesetzten Enzyme erfassen, geben Enzymaktivitätsbestimmungen in Leichenorganen nur Auskunft über die gebundene + freie Aktivität. Somit sind Deutungen der Enzymaktivitätsänderungen

unter physiologischen und pathologischen Bedingungen nur unter Berücksichtigung folgender Daten möglich: Substratkonzentrationsänderungen, Änderungen der biologischen Halbwertszeiten, Kettenlänge der Makromoleküle und Konzentrationen der Mucopolysaccharid-Spaltprodukte, wie Hexosamin und Uronsäure.

Betrachtet man die in unseren Untersuchungen gemessenen Aktivitätsänderungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im hyalinen Knorpel und in den Gefäßwänden zusammen mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen, so sind Rückschlüsse auf die tatsächlichen Stoffwechselvorgänge in den Geweben möglich.

COLLINS u. Mc. ELLIGOTT (43), die die Inkorporationsrate von $^{35}\text{SO}_4$ in die Mucopolysaccharidfraktion des hyalinen Knorpels bestimmten, fanden mit zunehmendem Alter eine herabgesetzte, im arthrotisch veränderten Knorpel eine gesteigerte Inkorporation als Ausdruck einer verminderten bzw. vermehrten Mucopolysaccharidsynthese.

KAPLAN, MEYER, GREILING, STUHLSATZ u.a. (44,45) konnten zeigen, daß es im degenerativ veränderten Gelenkknorpel zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der sauren Glycosaminoglycane kommt. Sie fanden eine Abnahme des Chondroitinsulfatgehaltes, eine Verringerung des Sulfatierungsgrades bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Sulfatkonzentration in der Gelenkflüssigkeit. Mit der absoluten Abnahme des Chondroitinsulfatgehaltes wurde auch eine Verkürzung der Kettenlänge der Chondroitinsulfat-Moleküle nachgewiesen. BARLAND, SANDSON u. JAHIS (46), die das Verhalten von Knorpelgewebe gegenüber Immunfluoreszenzstoffen untersuchten, zeigten, daß mit Hyaluronidase inkubierter Knorpel ein ähnliches Ver-

halten aufweist wie arthrotisch verändertes Knorpelgewebe. Alle diese Befunde, zusammen mit den in unseren Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen, veranlaßten uns zur Aufstellung einer Arbeitshypothese, die in der Pathogenese der Arthrose eine Rolle spielen könnte (D. PLATT u. M. DORF, Z. Rheumaf. 27 (1968) 291).

Ebenso wie im Knorpelgewebe kommt den Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen auch in der Gefäßwand eine wichtige Funktion zu. So müssen mit dem Blutstrom transportierte Substrate, die die Intimazellen der Aorta erreichen sollen, zunächst das Endothel und die subendotheliale Grundsubstanz passieren (Abb. 6). Auf dieser Strecke üben die Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe auf Grund ihrer Porengröße eine Siebfunktion aus, indem nur Moleküle bestimmter Größe passieren können. Eine Störung dieser Struktur, sei es durch eine Fehlsynthese oder einen gestörten Abbau, hat einen fehlerhaften Transport zur Folge. Mittels radioaktiv markiertem $^{35}\text{SO}_4$ und ^{14}C -Leucin konnten HILZ et al (11) zeigen, daß arteriosklerotisch veränderte Aorten eine Steigerung der Mucopolysaccharid- und Proteinsynthese aufweisen. JUNGE-HÜLSING (47) fand bei Patienten mit arteriosklerotischen Veränderungen eine gesteigerte Mucopolysaccharidausscheidung. Wir konnten in unseren Untersuchungen mit zunehmenden arteriosklerotischen Umbauvorgängen eine Aktivitätssteigerung der Enzyme messen, die den Abbau der sauren Mucopolysaccharide katalysieren. Unsere elektronenoptischen Untersuchungen an der menschlichen Aortenwand (D. PLATT u. B. SCHNORR, Klin. Wschr. 47 (1965) 291) könnten dafür sprechen, daß der größte Teil der Glycosaminoglycano-

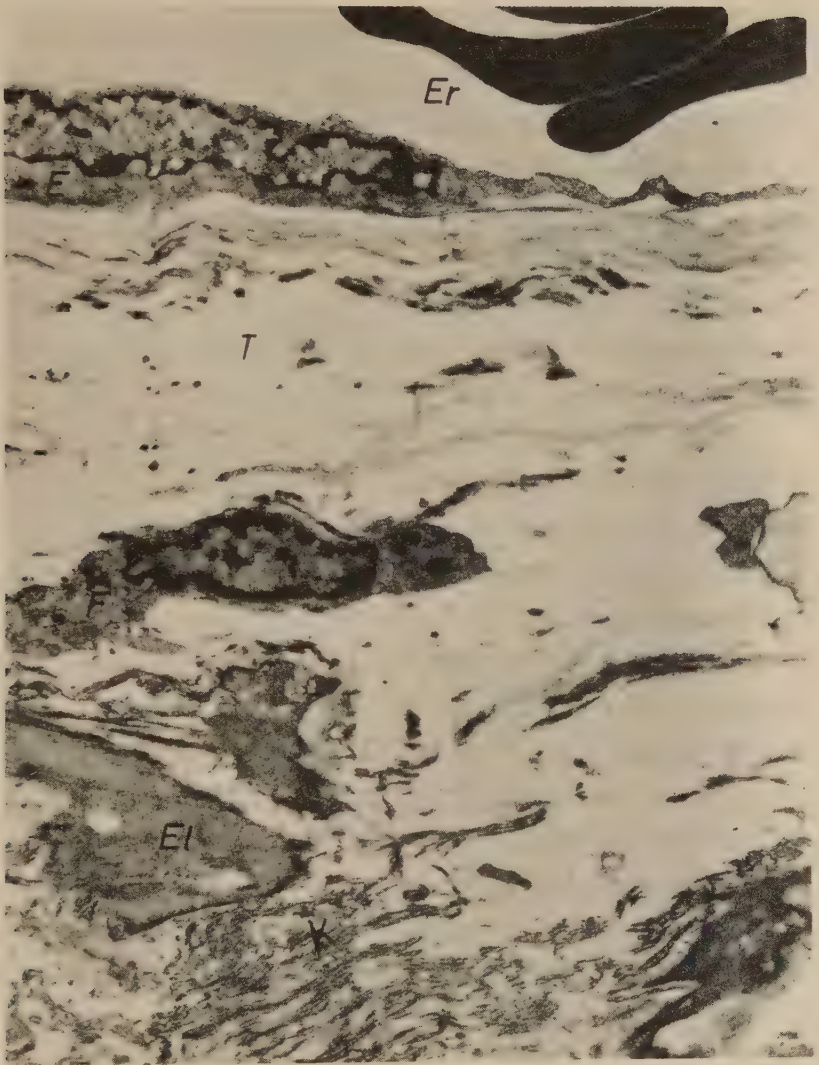


Abb. 6

(B. Schnorr und D. Platt: Elektronenoptische Untersuchungen an der Aortenwand, in Arbeit; E = Endothel, El = elastische Membran, Er = Erythrozyten, F = Fibroblast, K = kollagene Fasern, T = Transportstrecke)

Hydrolasen in freier Form vorliegt. Ebenso lassen Aktivitätsmessungen von Enzymen des Embden-Meyerhof-Zyklus, des Citrat-Zyklus und der Atmungskette (38) an eine schwere Stoffwechselschädigung der Gefäßwandzellen denken, die den Austritt lysosomaler Enzyme begünstigt.

Unter Berücksichtigung aller dieser Befunde möchten wir den Glycosaminoglycano-Hydrolasen für die Entstehung des Initial-oedems und die sich anschließenden Veränderungen eine wichtige Funktion zusprechen (D.PLATT u. H.P. LUBOEINSKI, *Angiologica*, 6 (1969) 19).

Während die Aktivitätsmessungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im hyalinen Knorpel und in Gefäßwänden signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von Alter und degenerativen Veränderungen aufweisen, zeigen die Serum-Aktivitätsmessungen im Verlaufe der Schwangerschaft, daß physiologische hormonelle Umstellungen im Organismus ebenfalls zu signifikanten Aktivitätsänderungen der am Abbau der sauren Glycosaminoglycane beteiligten Enzyme führen. Die Aktivitätssteigerungen könnten eine pathogenetische Bedeutung für die Auflockerungsvorgänge des Bindegewebes haben, indem über gesteigerte Depolymerisationsvorgänge das in den Mucopolysaccharid-Proteinkomplexen gebundene Wasser frei wird. (D.PLATT u.M.PLATT, *Gynaecologia*, in Druck).

Die Aktivitätssteigerungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen in Serum und Leberstanzzyklindern in den einzelnen Stadien der Lebererkrankungen, sowie die gesteigerten Inkorporationsraten von $^{35}\text{SO}_4$, ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Asparaginsäure in Leber-

stanzzyllindern bei akuter und chronischer Hepatitis (32, 33) und die Zunahme von Aminosuckern, Uronsäure und Hydroxyprolin bei Zirrhosen (31) könnten im Sinne von HAUSS (47) als eine gesteigerte, unspezifische mesenchymale Reaktion gedeutet werden (D.PLATT u. B.LEINWEBER, Acta hepato-splenol., in Druck).

Die in zahlreichen Untersuchungen (48, 49) durchgeführten Aktivitätsmessungen von Enzymen, die am Abbau neutraler und saurer Mucopolysaccharide beteiligt sind und die in den vorliegenden Untersuchungen an 2 Typen von Mucopolysaccharidase erhobenen Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß der vermehrten Substratablagerung in den Organen eine fehlgesteuerte Synthese der Glycosaminoglycane zugrunde liegt. Spezifische Dermatansulfat- und Heparitinsulfat- depolymerisierende Enzyme wurden bisher allerdings nicht nachgewiesen. Die von uns gefundenen Aktivitätssteigerungen der Glycosaminoglycano-Hydrolasen sind als sekundäres Phänomen auf die primär vermehrt abgelagerten Substrate anzusehen. (D.PLATT u.Fr.KOCH, Klin. Wschr. 47 (1969)888).

VERZEICHNIS DER SONDERDRUCKE

Sonder-
druck-Nr.

- 1 D. Platt: Glycosaminoglycano-Hydrolasen im menschlichen Serum, Blut 15 (1967) 274
- 2 D. Platt und R. Hartmann: Hyaluronidase-, β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität in epithelialen und mesenchymalen menschlichen Geweben, Klin. Wschr. 45 (1967) 998
- 3 D. Platt und U. Stein: Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharid-Protein-Stoffwechsel in menschlichen Organen, Z. klin. Chem. u.klin.Biochem. 7 (1969) 374
- 4 D. Platt und M. Dorn: Glycosaminoglycano-Hydrolasen im menschlichen Rippen- und Kniegelenknorpel, Z. ges. exp. Med. 147 (1968) 253
- 5 D. Platt und M. Dorn: Nachweis, Reinigung und Eigenschaften der Glycosaminoglycano-Hydrolasen im menschlichen hyalinen Knorpel, Clin. Chim. Acta, 21 (1968) 333
- 6 D. Platt und M. Dorn: Die Bedeutung der Glycosaminoglycano-Hydrolasen in der Pathogenese des degenerativen Rheumatismus, Z. Rheumaforschung 27 (1968) 291
- 7 E. Buddecke und D. Platt: Nachweis, Reinigung und Eigenschaften der Hyaluronidase aus der Aorta des Rindes, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem.343 (1965) 61
- 8 D. Platt, G. Beneke und E. Buddecke: Untersuchungen zur Vergleichbarkeit chemischer und histochemischer Befunde von arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten, Klin. Wschr. 45 (1967) 542

- 9 D. Platt: Hyaluronidase-, β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität in normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten, Klin. Wschr. 45 (1967) 92
- 10 D. Platt und H.P. Luboeinski: Der katabole Mucopolysaccharidstoffwechsel der menschlichen Aortenwand in Abhängigkeit vom Alter, Z. Gerontol. 2 (1969) 17
- 11 D. Platt und H.P. Luboeinski: The activities of glycosaminoglycan hydrolases of normal and atherosclerotic human aorta, Angiologica 6 (1969) 19
- 12 D. Platt: Gefäßwandstoffwechsel und Arteriosklerose, Med. Klin. 64 (1969) 1261
- 13 D. Platt und B. Schnorr: Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten, Klin. Wschr., 47 (1969) 991
- 14 D. Platt und D. Pernice: Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel peripherer Gefäße in Abhängigkeit von Alter und Arteriosklerose, Z. Gerontol. 2 (1969) 150
- 15 D. Platt und M. Platt: Hyaluronidase-, β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität im menschlichen Serum während der Schwangerschaft, Klin. Wschr. 46 (1968) 768
- 16 D. Platt und M. Platt: Glycosaminoglycano-Hydrolasen in menschlichen Placenten, Eihäuten und Nabelschnüren, Zbl. Gynäkol. 91 (1969) 673
- 17 D. Platt und M. Platt: Untersuchungen zum Interzellularstoffwechsel während der Schwangerschaft, Gynaecologia, 166 (1969) 1

- 18 D. Platt: Körper-eigene und synthetische Inhibitoren der Hyaluronidase, *Arzneim. Forsch.* 19 (1969) 143
- 19 D. Platt und B. Leinweber: Untersuchungen zum katabolen Mucopolysaccharidstoffwechsel bei Lebererkrankungen, *Acta hepato-splenol.*, 16 (1969) 324
- 20 D. Platt und Fr. Koch: Erhöhung der Hyaluronidase-, β -Glucuronidase- und β -Acetylglucosaminidase-Aktivität im Serum bei Mucopolysaccharidosen, *Klin. Wschr.* 47 (1969) 838

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. DELBRÜCK, A.: Untersuchungen über Enzyme des Energiestoffwechsels im Bindegewebe
Klin. Wschr. 40 (1962) 677
2. DELBRÜCK, A.: Enzymverteilungsmuster gefäßloser Gewebe
Klin. Wschr. 41 (1963) 488
3. JUNGE-HÜLSING, G.: Untersuchungen zur Pathophysiologie des Bindegewebes,
Dr. A. Hüthig Verlag, Heidelberg (1965)
4. MATHEWS, M.B. and I. LOZAITYTE: Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage
I. Molecular weight and shape
Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 158
5. BUDDECKE, E., KRÖZ, W. and E. LANKA: Chemische Zusammensetzung und makromolekulare Struktur von Chondroitinsulfat-Protein
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 331 (1963) 196
6. BUDDECKE, E. und M. SCHUBERT: Isolierung und chemische Zusammensetzung eines Chondroitinsulfat-Proteins aus der Aorta des Menschen
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 325 (1961) 189
7. GREILING, H. und H. STUHLSTADT: Struktur und Stoffwechsel von Glykosaminoglykan - Proteinen, I
Die Keratansulfat-Peptide der Rinder-Cornea
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345 (1966) 236
8. RODEN, L. und R. SMITH: Structure of the neutral trisaccharide of the chondroitin-4-sulfate linkage region
J. biol. Chem. 24 (1966) 5949
9. LINDAHL, A.: The structures of xylosylserine and galactosylxylosylserine from heparin
Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 130 (1966) 361
10. FRIMMER, M. und E. BUDDECKE: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus permeationsfördernder basischer Polypeptide
Z. Naturforsch. 19 (1964) 789
11. HILZ, H. und D. UTERMANN: Der Sulfatstoffwechsel der Gefäßwand in Beziehung zur Arteriosklerose und seine Beeinflussung durch Sexualhormone
Biochem. Z. 332 (1960) 376

12. KIRSIG, H.J. und H. HILZ:
Abstr.Tag. Ges.Physiol. Chem. Köln, 1964
13. UTERMANN, D., ERICH, C., MARTENS, K. und H. HILZ: Über Veränderungen des Gefäßstoffwechsels bei experimenteller Rattenarteriosklerose vom Mönckeberg-Typ
Klin. Wschr. 44 (1966) 1028
14. KRESSE, H. und E. BUDDECKE: Stoffwechselheterogenität von Chondroitin-4-sulfat-Proteinen und Kollagenstoffwechsel in Rindernasenknorpel
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349 (1968) 1497
15. GREILING, H., STUHLSATZ, H.W. und L. PLAGEMANN: Die Chondroitin-4-sulfat-Peptide der Rindercornea
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348 (1967) 121
16. BUDDECKE, E. KRÖZ, E.W. und W. TITTOR: Chondroitinsulfat-Protein aus Rindernasenknorpel - Beziehungen zwischen makromolekularen Eigenschaften und Funktion
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 348 (1967) 651
17. BUDDECKE, E. und E. WERRIES: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand (VII): Reinigung und Eigenschaften der β -Acetylglucosaminidase aus der Aorta des Rindes
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 340 (1965) 257
18. BUDDECKE, E. und D. PLATT: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand (VIII): Nachweis, Reinigung und Eigenschaften der Hyaluronidase aus der Aorta des Rindes
Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 343 (1965) 61
19. BUDDECKE, E. und O. HÖFELE: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand (IX): Reinigung und Eigenschaften der β -Glucuronidase aus der Aorta des Rindes
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 347 (1966) 173
20. NEWMAN, J.K., BERENSON, G.S., MATTHEWS, M.B., GOLDWASSER, E., and A. DORFMAN: The isolation of the non-specific hyaluronidase inhibitor of human blood
J. Biol. Chem. 217 (1955) 31
21. MORGAN, W.T.J. and L.A. ELSON,
Biochem. J. 28 (1934) 988
22. BERNFELD, P. and W.H. FISHMAN: β -glucuronidase I. Purification of calf spleen β -glucuronidase
J. Biol. Chem. 202 (1953) 757
23. PUGH, D., LEABACK, D.H. and P.G. WALKER: N-acetyl- β -glucosaminidase in rat kidney
Biochem. J. 65 (1957) 464

24. STAUDINGER, H.J.: Physiologisch-Chemisches Praktikum an der Justus-Liebig-Universität Giessen. 2.Aufl. (als Manuskript gedruckt)
25. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1964)
26. MILLER, E.J., van der KORST, J.K. and L. SOKOLOFF: Collagen of human articular and costal cartilage Arthritis and Rheumatism 12 (1969) 21
27. LOEWI, G. and R. CONSDEN: Acid mucopolysaccharides of the human uterus Nature, Lond. 195 (1962) 148
28. ZACHARIAE, F.: Studies on the mechanism of ovulation. Permeability of the blood-liquor barrier Acta Endocrin. 27 (1958) 339
29. ASBOE-HANSEN, G.: Hormones and Connective Tissue Munksgaard, (1966) 274
30. de DUVE, C., WATTIAUX, R. and M. WIBO: Effect of rat soluble compounds on lysosomes in vitro. Biochem. Pharmacol. 2 (1962) 97
31. BECKER, K.: Untersuchungen zum Stoffwechsel der sauren Glycosaminoglycane der Leber bei menschlicher und experimenteller Leberzirrhose Verhandl. der Dtsch. Gesellsch. f. Innere Medizin Thieme, Stuttgart, (1967) 264
32. HAUSS, W., JUNGE-HÜLSING, H.G., MANITZ, G. und F.KÖNIG: Über die Aktivität des Mesenchymstoffwechsels bei krankhaften Prozessen der Leber Dtsch. Med. Wschr. 89 (1963) 811
33. RICHTER, E.S., CLAUDITZ, S., LEINWEBER, B. und H.A.KÜHN: Proteinsynthese in Leberpunktaten von Patienten mit akuter Hepatitis Acta hepato-splenol. 15 (1969) 376
34. de DUVE, C.: in Lysosomes, A Ciba Foundation Symposium M.P. Cameron, London (1963)
35. NOVIKOFF, A.B., BEAUFAY, H. and C. de DUVE: Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver J.biophys. biochem. Cytol. Suppl. 2 (1956) 179
36. WEISSMANN, G. and J.T. DINGLE: Release of lysosomal protease by ultraviolet irradiation and inhibition by hydrocortisone Exp.Cell. Res. 25 (1961) 207

37. HEGNER, D.: Die protektive Wirkung verschiedener Pharmaka auf Membranen isolierter Granula aus polymorph-kernigen Leukozyten des Rindes
Arzneim. Forsch. 19 (1969) 131
38. BUDDECKE, E.: Biochemische Grundlagen der Pathogenese arterieller Verschlußkrankheiten
Regensburger Ärztl. Fortbild. 13 (1965) 189
39. HELD, E., HÖFELE, O., REICH, G., STEIN, U., WERRIES, E. und E. BUDDECKE: Wirkungssynergismus Chondroitin-4-sulfat-Protein abbauender Enzyme des Arterien-gewebes.
Z.klin.Chem. und klin. Biochem. 6 (1968) 244
40. de DUVE, C. and R.W. WATTIAUX: Function of lysosomes
An. Rev. Physiol. 28 (1966) 435
41. WEISSMANN, G.: Lysosomes
New England J. Med. 273 (1965) 1143
42. WATTIAUX, R., WIBO, M. and P. BAUDHUIN: Influence of Triton WR-1339 on the properties of rat liver lysosome;
Ciba Foundation Symposium J. A. Churchill, Ltd.
London (1963) 176
43. COLLINS, D.H. and T.E. Mc ELLIGOTT: Sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritis of human articular cartilage
Ann. rheum. Dis. 19 (1960) 318
44. KAPLAN, D. and K. MEYER: Ageing of human cartilage
Nature (London) 183 (1959) 1267
45. GREILING, H. und H.W. STUHLSATZ: Biochemische Untersuchungen zur Wirkungsweise eines Polysaccharidsulfates bei degenerativen Gelenkerkrankungen
Z.Rheumaforsch. 25 (1966) 116
46. BARLAND, P., SANDSON, J. and R. JANIS: Immunofluorescent studies of normal and osteoarthritic articular cartilage
Arthr. and Rheum. 7 (1964) 290
47. HAUSS, W.H., JUNGE-HÜLSING, G. und U. GERLACH: Die unspezifische Mesenchymreaktion
Thieme-Verlag, Stuttgart (1968)
48. HOOP, F. van, and H.G. HERS: The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidoses
Europ. J. Biochem. 7 (1968) 134
49. ÖCKERMANN, P.A. und P. KÖHLIN: Glycosidases in skin and plasma in Hunter's syndrome
Acta paediatr. Scan. 57 (1968) 281

50. TANAKA, K. and T. JIZUKA: Suppression of enzyme release from isolated rat liver lysosomes by non-steroidal anti-inflammatory drugs
Biochem. Pharmacol. 17 (1968) 2023

Meinem verehrten klinischen Lehrer
Herrn Prof. Dr. H.-G. Lasch
danke ich herzlichst für die großzügige Unterstützung
und Förderung dieser Arbeit sowie für zahlreiche
Anregungen und Diskussionen.

Meinem verehrten biochemischen Lehrer,
Herrn Professor Dr. E. Buddecke
danke ich aufrichtig für die theoretische Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. W. Sandritter
danke ich für die Überlassung des Untersuchungs-
materials.

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Hegner danke ich für
zahlreiche Anregungen und wertvolle Diskussionen.

Besonderer Dank gebührt allen meinen Mitarbeitern,
vor allem Fräulein A. Kolitsch für die Hilfe bei
der Durchführung der Versuche.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich
zu großem Dank verpflichtet für die finanzielle
Unterstützung.

